

磁珠富集法分离柿微卫星标记

阮小凤¹,Gabi Krczal²,杨 勇¹

(1 西北农林科技大学 园艺学院,陕西 杨凌 712100;2 莱茵兰普法尔茨州植物研究所,67435 Neustadt/WeinstraÙe,德国)

【摘 要】 【目的】分离柿属植物的微卫星标记,为柿种质资源的分类、进化等遗传研究奠定基础。【方法】提取磨盘柿(*Diospyros kaki*)基因组 DNA 后,用 *EcoR* I 和 *Mes* I 2 种内切酶酶切并连接接头,再用接头特异引物进行 PCR 扩增。扩增产物与生物素标记的 (GA)₁₅ 和 (AC)₁₅ 探针杂交,杂交复合物用链亲和素包裹磁珠进行结合,得到单链 DNA 目标片段,经 PCR 扩增,连接 pGEM-T 载体,转化入感受态大肠杆菌,得到微卫星富集小插入片段 DNA 文库。用 Colony-PCR 法筛选阳性克隆,进行测序分析。【结果】测序 96 个克隆,54 个含微卫星序列,24 个为有效微卫星序列,其中完美型(perfect)9 个,占 37.5%;非完美型(imperfect)7 个,占 29.2%;混合型(compound)8 个,占 33.3%。(GA)_n 重复最为常见。21 条含微卫星序列已登录 GenBank (Accession Number: EF567396~EF567416)。成功设计 21 对引物,经初步筛选,14 对表现出多态性。【结论】试验方法分离柿基因组微卫星简便有效,得到的多态性引物可用于柿种质资源的遗传研究。

【关键词】 柿;微卫星;磁珠富集

【中图分类号】 S188;S665.202.4

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2008)05-0097-06

Isolation of microsatellite in *Diospyros kaki* by magnetic beads

RUAN Xiao-feng¹,Gabi Krczal²,YANG Yong¹

(1 College of Horticulture, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 RLP AgroScience, AlPlanta, Institute for Plant Research, 67435 Neustadt/WeinstraÙe, Germany)

Abstract: 【Objective】 Isolating microsatellite markers of persimmon is important for germplasm resources, the classification and evolution of persimmon’s genetic study. 【Method】 Genomic DNA of *Diospyros kaki* cv Mopanshi was extracted and digested with restriction enzyme *EcoR* I and *Mes* I. Adapters were ligated to the end of restriction fragments. Ligated products were amplified by PCR with primers complementary to adapters. The PCR products were hybridized with biotin-labelled Oligo (GA)₁₅ and (AC)₁₅ probes, hybridized complex was fished by magnetic beads coated with streptavidin. Then selected fragments were amplified by using adapter specific primers and cloned into pGEM-T vectors and transformed into *E. coli* hosts, SSR enriched genomic DNA library was constructed. 96 clones were selected by colony-PCR method and then sequenced. 【Result】 24 distinct microsatellite loci were detected. Of these sequences, 9 (37.5%) were perfect repeat motif, 7 (29.2%) imperfect and 8 (33.3%) compound repeat motifs. (GA)_n motif was the most common repeat. PCR primers were designed for 21 loci. GenBank Accession Number was EF567396—EF567416. 【Conclusion】 14 of the primer pairs were characterized with polymorphism by this simple and effective method, and could be used for genetic studies on *Diospyros* spp.

Key words: *Diospyros kaki*; microsatellite; magnetic beads enriched library

* 【收稿日期】 2007-05-29
【基金项目】 科技部国家科技基础条件平台项目(2005DKA21002-22)
【作者简介】 阮小凤(1961—),女,陕西耀县人,副教授,硕士,主要从事果树分子生物学及资源鉴定评价研究。
【通讯作者】 杨 勇(1964—),男,陕西宝鸡人,副教授,硕士,主要从事柿种质资源收集保存与鉴定评价研究。

微卫星 DNA(microsatellite DNA) 又称简单重复序列(simple sequence repeat, SSR), 是一类由数个(多为 1~6)碱基组成的串联重复 DNA 序列。现已证明, 微卫星 DNA 存在于绝大多数真核生物基因组中^[1]。尽管微卫星序列的重复长度具有高度的可变性, 但其两端的侧翼序列多为保守的单拷贝序列, 因此可以根据微卫星两端的序列设计出一对特异引物, 采用 PCR 技术扩增该位点微卫星序列, 其长度多态性可作为 DNA 标记。由于微卫星标记具有多态性高、特异性强、重复性好、标记呈共显性等优点^[2], 已广泛应用于动植物遗传图谱构建、基因定位、分子标记辅助育种、品种鉴定、家系分析和进化研究等方面^[3]。但 SSR 标记应用的前提是要开发足够多的位点特异引物, 即首先要分离出微卫星序列。对大田作物如水稻、小麦等微卫星标记的研究起步较早, 已有大量微卫星标记可供利用, 而对果树微卫星标记的开发, 目前还远远不能满足研究的需要。

微卫星标记开发的传统方法是构建基因组 DNA 文库, 通过菌落原位杂交筛选出含有微卫星序列的克隆, 该方法简单, 易掌握, 但必须对每个克隆进行筛选, 工作量大, 需花费大量人力财力, 而且效率较低^[4]。从已有的核酸序列中进行检索, 也是获得 SSR 标记的简单方法^[5], 但可检索的资源相对有限。Lian 等^[6]提出了采用 ISSR-PCR 法开发 SSR 标记, 但未得到广泛应用。微卫星富集法因具有快速高效的特点^[7-9], 自 1992 年 Ostrander 等^[10]首次报道以来, 在各方面得到了广泛应用。富集方法是通过标记的 SSR 探针与基因组 DNA 片段杂交, 用磁珠将杂交复合物分离出来, 得到 SSR 富集 DNA 片段, 构建 SSR 富集 DNA 文库, 从中筛选阳性克隆。其磁珠富集原理是基于磁珠表面包蔽的链亲和素与标记于微卫星探针上的生物素之间的共价结合^[11]。

柿(*Diospyros kaki*) 起源于我国, 分布广泛, 资源十分丰富, 其面积和产量均为世界第一。目前, 我国国家柿种质资源圃收集保存的柿种质资源有近 700 份, 90% 为我国原产, 但对这些资源的起源、演化和亲缘关系还缺乏分子水平的深入探讨。磨盘柿是我国河北地区的主要栽培品种, 在我国单一品种中的栽培面积最大, 是具代表性的中国柿品种。本试验采用磁珠富集法, 从磨盘柿基因组 DNA 中分离微卫星分子标记, 以期为我国柿的分类、进化等遗传研究奠定基础, 并进一步丰富柿属植物的微卫星

标记引物。

1 材料与方法

1.1 材料

供试植物材料来自位于陕西杨凌的国家柿种质资源圃。春季采刚萌发尚未展叶的柿幼芽, 硅胶干燥备用。

1.2 方法

1.2.1 柿基因组 DNA 的提取 基因组 DNA 的提取采用 CTAB 法^[12], 以乙醇沉淀法纯化 DNA 初提液。用紫外分光光度计(UV-1602 PC Photometer, Shimadzu)测定 230, 260 和 280 nm 处的吸光值。根据 OD_{260}/OD_{280} 值和 OD_{260}/OD_{230} 值估测其纯度, 根据 OD_{260} 值估测其质量浓度。调整质量浓度为 100 ng/ μ L, 并用 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA 的完整性。

1.2.2 柿基因组 DNA 的酶切、接头连接及连接产物的扩增 用 *EcoR* I 和 *Mes* I 双内切酶酶切基因组 DNA, 接头连接与酶切在同一反应液中进行。*EcoR* I 接头分别由含 17 个碱基的寡核苷酸序列 5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3' 和含 18 个碱基的寡核苷酸序列 5'-AATTGGTACGCAGTCTAC-3' 组成; *Mes* I 接头分别由含 16 个碱基的寡核苷酸序列 5'-GACGATGAGTCCTGAG-3' 和含 14 个碱基的寡核苷酸序列 5'-TACTCAGGACTCAT-3' 组成。总反应液 25 μ L, 其中含基因组 DNA 200 ng, 内切酶各 5 U, 1 mmol/L ATP, 3 U 的 T_4 Ligase 连接酶, 0.5 μ mol/L 的 *EcoR* I 接头, 5 μ mol/L 的 *Mes* I 接头, 1 $\times$ Reaction Buffer。反应条件为 37 $^{\circ}$ C 保温 5 h, 8 $^{\circ}$ C 保温 4 h, 4 $^{\circ}$ C 过夜。用 *EcoR* I 接头特异引物 5'-GACTGCGTACCAATTC-3' 和 *Mse* I 接头特异引物 5'-GATGAGTCCTGAGATT-3', 对连接产物进行 PCR 扩增, 25 μ L 反应液含上述反应产物 2 μ L, 0.4 mmol/L dNTPs, 1 U 的 *Taq* DNA polymerase, 1 $\times$ PCR Reaction Buffer。反应完毕, 去除多余的引物、dNTPs 等, 电泳检测浓度及片段大小。

1.2.3 探针杂交及磁珠富集 采用先杂交后磁珠分离法, 也可先将微卫星探针与磁珠结合后再进行杂交。PCR 产物 95 $^{\circ}$ C、5 min 解链, 立即置于冰浴中; 取配制好的 6 $\times$ SSC+1 g/L SDS 各 100 μ L 于 3 个 1.5 mL Eppendorf 管中, 分别在 65 $^{\circ}$ C 保育; 然后各加入 5 μ L 10 μ mol/L 生物素标记的 SSR 探针 (AC)₁₅ 和 (GA)₁₅, 再加入 3 μ L 变性 PCR 产物。在

65 ℃ 杂交 1 h, 不时轻轻晃动混匀。

链亲合素包裹磁性小珠-Dynabeads M-280(Dynal, Norway) 的平衡处理按试剂盒说明进行。向 500 μL 处理好的磁珠悬浮液中加入上述杂交复合液, 室温保育 30 min, 不时晃动混匀, 使磁珠包裹的链亲和素与杂交复合物探针上的生物素充分结合。用磁珠集合仪(Dynal MPC-S) 吸附磁珠, 在磁场中吸走上清液。洗脱(洗去非特异性吸附)时杂交混合物用 400 μL 6×SSC+1 g/L SDS 在 50 ℃ 洗 2 次, 每次 15 min, 55 ℃ 洗 1 次, 10 min; 400 μL 2×SSC+1 g/L SDS, 1×SSC+1 g/L SDS, 0.1×SSC+1 g/L SDS 在 50 ℃ 分别洗 2 次, 每次 15 min; 最后再用 400 μL 0.1×SSC 室温洗 1 次, 10 min。吸净洗涤液后, 加入 50 mL ddH₂O, 90 ℃ 变性 5 min, 使目的 DNA 片段从杂交复合物上解离下来, 于磁场中收集上清液。

1.2.4 目标 DNA 片段的克隆 取 2 μL 收集液, 用接头引物进行 PCR 扩增, 25 μL 反应体系, 取 2 μL PCR 产物连接到载体 pGEM-T Easy Vectors (Promega) 上, 然后转化到高感受态大肠杆菌(*E. coli*) 中。涂抹于含有 Ampicillin (100 mg/L)、IPTG (80 μmol/L)、X-gal(70 μg/mL) 的 LB-琼脂平板培养基上, 37 ℃ 培养过夜。挑取直径 0.5~1.0 mm 的白色单个菌落, 在 1 mL 含 Amp 的 LB 液体培养基中, 37 ℃ 振荡活化过夜培养。

1.2.5 阳性克隆的筛选及测序 以菌液为模板, 用 PCR 法筛选重组克隆^[13]。直接取 1 μL 菌液, 用载体克隆位点两端的 SP₆ 和 T₇ 引物进行 PCR 阳性克隆筛选, 也可用接头特异引物进行插入片段 PCR。PCR 产物用 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测, 选择插入片段长度在 200~600 bp 的克隆测序。克隆质粒 DNA 的提取、纯化采用 Eppendorf“Fast Plasmid Mini”试剂盒, 测序反应液的准备用 BigDye Termi-

nator version 1.1 Cycle Sequencing 试剂盒, 按说明书进行, 在 ABI PRISM 377 DNA 测序仪上(Applied Biosystems) 进行测序。

1.2.6 序列分析、引物设计及多态性检测 测序得到的原始序列用 Clone Managen 7 和 Align Plus 5 软件进行分析, 找到微卫星重复类型、接头序列, 得到真正的基因组片断, 剔除重复、无用的序列, 对含有微卫星的独一无二序列用 Primer Designer 5 软件设计引物。引物的多态性检测用 6 个柿基因型作 PCR, 产物先在 2 g/L 的琼脂糖凝胶上电泳, 溴化乙锭染色观察, 得到预期大小的片段, 再用 60 g/L 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 银染检测。PCR 反应液含 50 ng DNA, 0.2 mmol/L dNTPs, 2 mmol/L MgCl₂, 5 pmol/L 引物, 1 U *Taq* DNA polymerase, 1×buffer (10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.3, 50 mmol/L KCl)。PCR 条件为: 94 ℃ 变性 5 min; 94 ℃ 变性 45 s, 复性 45 s, 72 ℃ 延伸 90 s, 35 个循环; 72 ℃ 延伸 7 min。各引物的最适退火温度(*T_a*) 用 Mastercycler ep Gradient (Eppendorf) 梯度 PCR 仪优化筛选。

2 结果与分析

2.1 含柿基因组片段的阳性克隆数及其测序结果

以菌液为模板, 用 PCR 法共筛选重组白色克隆 216 个(部分结果见图 1), 含有插入片段的阳性克隆为 183 个。随机挑选片段长度在 200~600 bp 的 96 个克隆测序, 图 2 为含有 SSRs 的克隆测序峰图。测序结果经 Clone Managen 7 和 Align Plus 5 软件分析, 54 个序列含微卫星, 但一些是无用的、或重复的、或不完整的、或微卫星太靠近两头而无法设计引物, 有 23 个独有序列含 24 个 SSRs 可以设计引物, 已在 GeneBank 登录 21 条(GenBank Accession Number 为 EF567396~EF567416)。

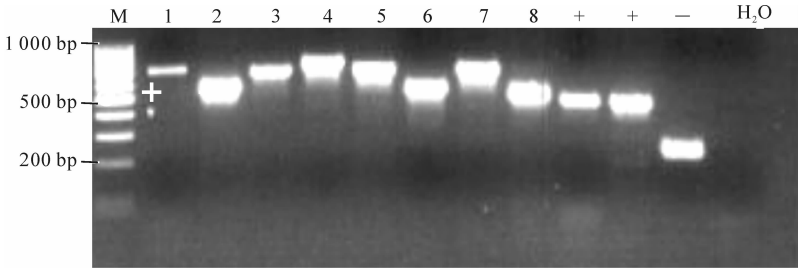


图 1 PCR 筛选柿基因组阳性克隆的电泳结果

M. Marker; 1~8. 白色克隆; +. 阳性对照; -. 阴性对照

Fig. 1 Screening of positive clones by PCR of persimmon genomic DNA, electrophoresis of agarose gel
M. Marker; 1-8. White clone; +. Positive control; -. Negative control

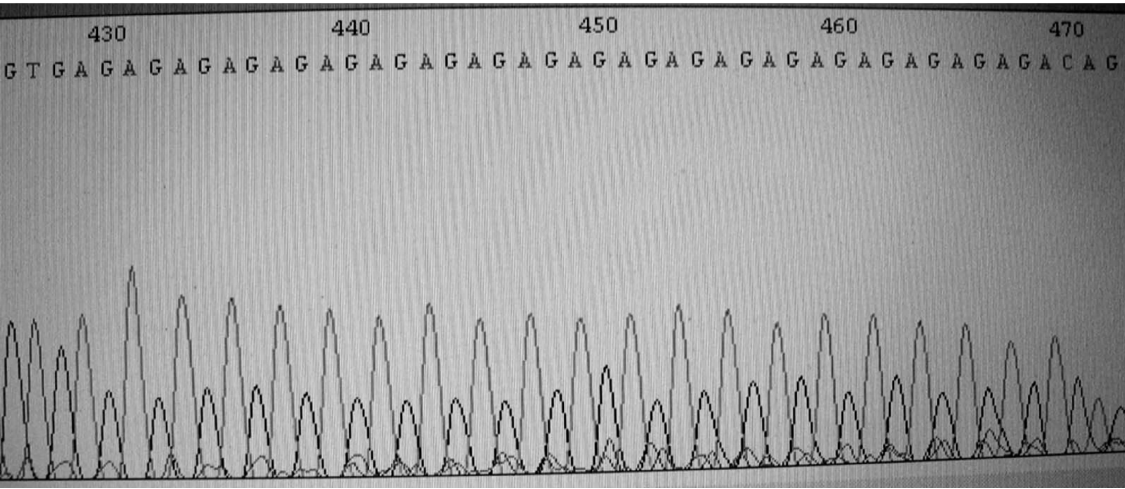


图 2 磨盘柿基因组中含微卫星(GA)_n 的重复序列

Fig. 2 Typical microsatellite (GA)_n repeat sequence in *Diospyros kaki* cv Mopanshi

2.2 柿微卫星序列的特征分析

根据 Weber^[14]提出的微卫星序列分类标准,对所获得的 24 个微卫星序列进行归类(表 1)。从表 1 可以看出,完美型的微卫星有 9 个,占 37.5%;非完美型的 7 个,占 29.2%;混合型 8 个,占 33.3%。重复碱基数以双核苷重复最为常见,其中又以(GA)_n/(TC)_n 重复为最多,24 个序列中 19 个出现该重复,占 83%,(AC)_n/(TG)_n 重复在 5 个序列中出现,也出现 5 次 A_n 单核苷重复,2 次(AT)_n 重复,还观察到 TAAA、GAT、GAA、GTAT 重复单位。完美型的重复次数为 10~21 次,多为 20 次上下。混合型和不完美型重复序列则更长。

表 1 柿微卫星富集 DNA 文库中微卫星序列的特性

Table 1 Character of microsatellite sequences from an enriched library in *Diospyros kaki*

位点 Locus	重复序列 Repeat motif	微卫星序列分类 Microsatellite type	位点 Locus	重复序列 Repeat motif	微卫星序列分类 Microsatellite type
mDP01	(GA) ₂₁	P	mDP13	(TG) ₁₇	P
mDP02	(GA) ₁₁ A ₃ (GA) ₈	I	mDP14	A ₁₅ -(GA) ₂₁	C
mDP03	A ₁₀ (GA) ₈ (TAAA) ₂	C	mDP15	(AC) ₁₃ (AT) ₄	C
mDP04	(TC) ₁₉	P	mDP16	(TG) ₁₀	P
mDP05	(GA) ₁₅ G ₄ (GA) ₁₀	I	mDP17	(GA) ₂₁	P
mDP06	A ₁₅ -(GA) ₁₉	C	mDP18	(GA) ₁₇	P
mDP07	(TC) ₁₅ (AC) ₁₄	C	mDP19	(AT) ₄ (GTAT) ₂	I
mDP08	(TC) ₁₃ (CA) ₂₀	C	mDP20	(AT) ₂ (GA) ₁₇	P
mDP09	(GA) ₁₂ -(GA) ₃ -(GA) ₃	I	mDP21	(GA) ₈ -(GA) ₈	I
mDP10	(TC) ₄ (GAT) ₂ (TC) ₁₇	C	mDP22	(GA) ₂₀	P
mDP11	A ₁₀ (GA) ₁₀	I	mDP23	(TC) ₁₈	P
mDP12	(TG) ₁₁ (AG) ₂₀ [AC(AG) ₂] ₂ [AC(AG) ₃] ₂ G ₃ (AG) ₃ G ₅ (AG) ₉	C	mDP24	(GA) ₂₁ (GAA) ₄ -(GA) ₃	I

注:P. 完美型;I. 非完美型;C. 混合型
Note: P. Perfect; I. Imperfect; C. Compound

2.3 柿微卫星引物的初步筛选

成功设计引物 21 对,对每对引物进行 PCR 扩增检测评价,其中 14 对引物表现为多态性,1 对引物为单态性,其他引物在仅改变退火温度的条件下没有得到 PCR 产物,可能需要进一步优化 PCR 条件。其中的一对引物 mDP13 对 6 个柿基因型 PCR 的扩增结果,用 60 g/L 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,银染观察,结果见图 3。该引物对柿种中 3 个品种(磨盘柿、芦州府和尖柿)分别检测到 2 条、3 条和 4 条微卫星 DNA 带,对其他柿属 3 个种(乌柿、油柿和浙江柿)虽只检测到 1 条微卫星 DNA 带,但各条带大小不同。说明 mDP13 引物为高多态性引物。

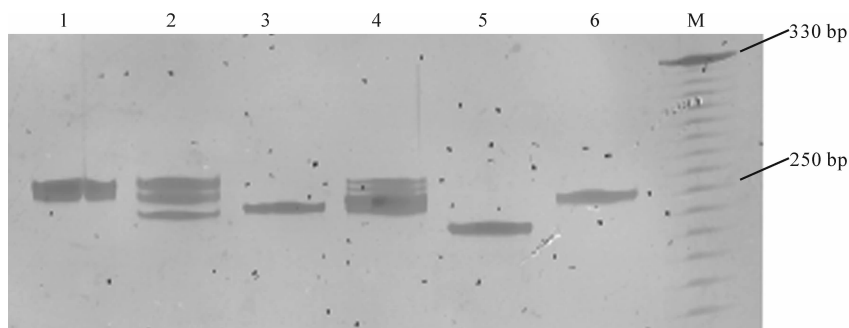


图 3 引物 mDP13 在 6 个柿基因型中表现出的多态性

1. 磨盘柿;2. 芦州府;3. 乌柿;4. 尖柿;5. 油柿;6. 浙江柿;M. Marker (10-bp DNA Ladder)

Fig. 3 Polymorphism of primer pair mDP13 on 6 persimmon genotypes

1. Mopanshi;2. Luzhoufu;3. *D. eathayensis*;4. Jianshi;5. *D. oleifera*;6. *D. glauaeifolia*;M. Marker (10-bp DNA Ladder)

3 讨 论

用经典的构建和筛选小插入片段基因组文库的方法分离含 SSR 序列的克隆,获得阳性克隆的效率很低,只有 1%~3%,而应用微卫星富集法,可以使 SSR 阳性克隆的得率提高到 50%~60%^[4]。本试验应用生物素标记 SSR 探针杂交富集 SSR 片段,用包裹有链亲和素的磁性小珠回收结合产物,避免了使用传统的同位素标记杂交,安全、省时、方便。对构建的 SSR 富集 DNA 文库进行初步筛选、测序,微卫星阳性得率为 54%,有效克隆率为 23%。测序后出现重复或无用的 SSR 序列,主要是因为对 SSR 富集产物进行了 PCR 扩增造成的。

在用生物素标记的微卫星 (GA)₁₅ 和 (AC)₁₅ 探针杂交时,杂交温度是影响杂交特异性的主要因素,而杂交温度应根据探针序列的 T_m 决定。(GA)₁₅ 和 (AC)₁₅ 的 T_m 为 68.1 °C,杂交温度应比 T_m 略低,本试验采用 65 °C 进行杂交。另外,磁珠回收微卫星片段后,洗涤缓冲液的浓度和洗涤温度也是影响 SSR 富集有效性的关键因素。洗涤的目的是除去非特异性吸附。作者发现,在洗涤缓冲液不变的情况下,洗涤温度越高,富集效率反而越低,这与 Giovannim 等^[15]的结果一致。在本试验中,杂交温度 65 °C、洗涤温度最高到 55 °C 时,效果比较理想。按照 Edwards 等^[16]建议的 65 °C 洗涤,微卫星富集效率反而很低,所以认为,有必要对试验研究的不同基因组的物种或树种在建立 SSR 富集文库时,根据探针 Oligo 的特性(T_m)确定杂交温度和洗涤温度。可应用几种不同温度试验,以找到适合该基因组的最适杂交和洗涤温度,尤以洗涤温度更为重要。

对阳性克隆的筛选,本试验采用了 PCR 筛选体

系,与噬菌斑原位杂交相比,该方法快速简单,适于大量单克隆的筛选,避免了使用放射性同位素,但筛选出的阳性克隆含有微卫星的比率比经过二次杂交筛选的要低,若要降低无效测序数,则可用同位素或 digoxigenin 标记的相同探针进行二次杂交筛选。

本试验用双核苷重复探针 (AC)₁₅ 和 (GA)₁₅ 进行杂交富集,其测序结果为 (GA)_n 出现最多,而 (AC)_n 出现较少,同时也发现了单核苷重复如 (A)_n 出现在 5 个序列中,双核苷 (AT)_n 出现在 2 个序列中,说明 (A)_n 和 (AT)_n 为常见的存在于柿基因组中的微卫星,这与前人^[17-19]报道的简单重复序列在植物中出现的类型及频率具有一致性,他们的调查结果是 (A)_n、(AT)_n、(GA)_n 和 (AAG)_n 在植物基因组中最为常见。得到的微卫星序列中,单元重复次数也较高,完美型都在 10 次以上,大多数在 20 次上下。根据 Weber^[14]等的观点,重复次数高的微卫星在种群中表现出的多态性较高。本试验中完美型、非完美型及混合型出现的频率差异不太明显。

[参考文献]

- [1] Tautz D, Renz M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes [J]. Nucleic Acids Res, 1984, 12: 4127-4138.
- [2] Gupta P K, Balyan I S, Sharma P C, et al. Microsatellites in plants—a new class of molecular markers [J]. Curr Sci, 1996, 70: 45-54.
- [3] Loerz H. Molecular marker systems in plant breeding and crop improvement [M]. Isbn Berlin, Heideiberg, New York: Springer, 2005.
- [4] Zane L, Bargelloni L, Patarnello T. Strategies for microsatellite isolation; a review [J]. Mol Ecol, 2002, 11: 1-16.
- [5] 郭大龙, 罗正荣, 柿和君迁子 SSR 分析技术的建立 [J]. 农业生物技术学报, 2004, 12(4): 386-389.

Guo D L, Luo Z R. Establishment of SSR technique of *Diospyros kaki* and *D. lotus* plants [J]. Chinese Journal of Agricultural Biotechnology, 2004, 12(4): 386-389. (in Chinese)

[6] Lian C, Zhou Z, Hogetsu T. A simple method for developing microsatellite markers using amplified fragments of inter-simple sequence repeat (ISSR) [J]. Journal of Plant Research, 2001, 114: 381-385.

[7] Fisher D, Bachmann K. Microsatellite enrichment in organisms with large genomes (*Allium cepa* L.) [J]. Biotechniques, 1998, 24: 796-802.

[8] Gao G Q, He G H, Li Y R. Microsatellite enrichment from AFLP fragments by magnetic beads [J]. Acta Botanica Sinica, 2003, 45 (11): 1266-1269.

[9] Mnejja M, Garcia-Max J, Howad W, et al. Development and transferability across prunus species of 42 polymorphic almond microsatellites [J]. Molecular Ecology Notes, 2005 (5): 531-535.

[10] Ostrander E A, Jong P M, Rine J, et al. Construction of small-insert genomic DNA libraries highly enriched for microsatellite repeat sequences [J]. Proc Na l Acad Sci, 1992, 89: 3419-3423.

[11] Kijas J M H, Fowler J C S, Garbet C A, et al. Enrichment of microsatellite from Citrus genome using biotinylated oligo-nucleotide sequences boundto streptavidin-coated magnetic particles [J]. Bio Techniques, 1994, 16: 657-662.

[12] Reichardt M, Rogers S. Current protocols in molecular biology [M]. New York: John Wiley & Sons, 1997: 233-237.

[13] Skinner D D, Denoya C D. Simple DNA polymerase chain reaction method to locate and define orientation of specific sequences in cloned bacterial genomic fragments [J]. Microbios, 1993, 75: 125-129.

[14] Weber J L. Informativeness of human (dC-dA)n(dG-dT)n polymorphisms [J]. Genomics, 1990, 7: 524-530.

[15] Giovannim C, Tinal M, Keith J E, et al. Optimization of a microsatellite enrichment technique in *Saccharum* spp [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1999, 17: 225-229.

[16] Edwards K J, Barker J H A, Daly A, et al. Microsatellite libraries enriched for several microsatellite sequences in plants [J]. Biotechniques, 1996, 20: 758-760.

[17] Lagercrantz U, Ellegren H, Andersson L. The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates [J]. Nucleic Acids Research, 1993, 21 (5): 1111-1115.

[18] Linda C, Luke R, Dan M, et al. Computational and experimental characterization of physically clustered simple sequence repeats in plants [J]. Genetics, 2000, 156: 847-854.

[19] Wang Z, Weber J L, Zhong G, et al. Survey of plant short tandem repeats [J]. Theor Appl Genet, 1994, 88: 1-6.

(上接第 96 页)

[25] 刘建辉, 崔鸿文. 电导法测定黄瓜抗寒性的研究 [J]. 西北农业大学学报, 1995, 23(4): 74-77.

Liu J H, Cui H W. The determination of the cucumber cold resistance by electric conductivity method [J]. Northwest Agricultural University, 1995, 23(4): 74-77. (in Chinese)

[26] 伊华林, 邹志远, 鲁忠芳, 等. 鄂柑 1 号抗寒力测定与 Logistic 方程的应用 [J]. 湖北农业科学, 1996(3): 46-48.

Yi H L, Zou Z Y, Lu Z F, et al. Determination on cold hardness of citrus Egan No. 1 and application of Logistic equation [J]. Hubei Agricultural Sciences, 1996 (3): 46-48. (in Chinese)

[27] 汤章诚. 逆境条件下植物脯氨酸的积累及其可能的意义 [J]. 植物生理学通讯, 1984, 20(1): 15-17.

Tang Z C. The Pro. cumulation of plant under adversity and it's possible significance [J]. Plant Physiology Communications, 1984, 20(1): 15-17. (in Chinese)

[28] 陈 贵, 胡文玉, 谢浦缔, 等. 提取植物体内 MDA 的溶剂及 MDA 作为衰老指标的探讨 [J]. 植物生理学通讯, 1991, 27 (1): 44-46.

Chen G, Hu W Y, Xie P D, et al. Exaction solvent of plant body internal MDA and discussion of MDA as aging index [J]. Plant Physiology Communications, 1991, 27 (1): 44-46. (in Chinese)

[29] 王 飞, 王 华, 陈登文, 等. 杏品种花器官耐寒性研究 [J]. 园艺学报, 1999, 26(2): 356-359.

Wang F, Wang H, Cheng D W, et al. Study on the hardiness of flower organ of Apricot varieties [J]. Acta Horticulturae Sinica, 1999, 26(2): 356-359. (in Chinese)

[30] 房经贵, 刘立攻, 章 镇, 等. 测定果梅枝条电导率的取样研究 [J]. 江苏林业科技, 2001, 28(4): 29-31.

Fang J G, Liu L Z, Zhang Z, et al. Studies on sampling for testing electric conductivity of fruiting-plum branches [J]. Journal of Jiangsu Forestry Science & Technology, 2001, 28(4): 29-31. (in Chinese)

[31] 郝丽娟, 邵青玲. 不同杏品种的抗寒性研究 [J]. 山西果树, 2006, 26(5): 3-5.

Hao L J, Shao Q L. Study on cold resistance in different Apricot cultivars [J]. Shanxi Fruits, 2006, 26 (5): 3-5. (in Chinese)

[32] 韦晓霞, 吴如键, 胡菡青, 等. 橄榄不同品种耐寒性的研究 [J]. 福建农业学报, 2005, 20(增刊): 90-92.

Wei X X, Wu R J, Hu H Q, et al. Study on cold resistance in Chinese olive cultivars [J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2005, 20(Supplement): 90-92. (in Chinese)